

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

قال الله تعالى

وَإِذَا مَرِضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ

صدق الله العظيم

سورة الشعراء الآية 80

Dedication

To

My

Beloved

Husband

&

Daughters

(Ameira)

ACKNOWLEDGEMENT

I am greatly indebted to my supervisor Dr. Mohammed A/ Rahim A/Alla, Head Department of Biochemistry, Faculty of Science, , Sudan University of Science and Technology, for his expert supervision, guidance, advice, motivation and support throughout the course of this study.

I am also grateful to the staff of the Chemistry Laboratory, Police Hospital, for their keen interest, encouragement , help and patience during this study.

Special thanks are due to Colonel Salah Ahmed Ibrahim and Dr. Suaad Yousif, Wafrapharma Laboratories, Millitary Hospital for their continuous encouragement and unflagging assistance.

Appreciation and thanks to Dr. Elmahi M., Faculty of Agriculture, U.K and Dr. Osman Khalil, El-fadil Ahmed Adam, College of Animal Production, S.U.S.T. for their continuous assistance.

Thanks are due to Mohammed Abusamra National Health Laboratory, for his deep interest and assistance.

And last, but never the least, I thank my family for their support, specially my husband who always encourages and helps me.

List of Contents

Contents	Page
Dedication	i
Acknowledgment	ii
List of Contents	iii
List of Tables	vi
List of Pictures	viii
List of Figures	ix
English Abstract	xi
Arabic Abstract (مستخلص الدراسة)	xv
Abbreviations	xviii
Chapter 1: Introduction & Literature Review:	1
1.1. Medicinal Plants	1
1.1.1. Uses of Medicinal Plants	2
1.1.2. Hypoglycemic Agents from Plants	4
1.1.3. Diabetic Complications of Medicinal Plants	7
1.1.4. Side Effects of Botanical Treatments	9
1.2. Diabetes mellitus	9
1.2.1. Clinical classification	9
1.2.1.1. Insulin dependent diabetes mellitus (IDDM)	9
1.2.1.2. Non-Insulin Depended Diabetes Mellitus (NIDDM)	10
1.2.1.3. Malnutrition – Related Diabetes Mellitus (MRDM)	12
1.2.1.4. Diagnosis of Diabetes	13
1.2.1.4.1. History and physical examination	13
1.2.1.4.2. Investigations:	13
1.2.1.4.3. Urine test	13
1.2.1.4.4. Blood test	13
1.2.2. Diabetic complication	14
1.2.2.1. Immediate Complications	14
1.2.2.1.1. Diabetic ketoacidosis	14
1.2.2.1.2. Hyperosmolar non-ketotic coma	14
1.2.2.1.3. Hypoglycemic coma	15
1.2.2.2. Long-term complications	15
1.2.2.2.1. Cardiovascular complications	15
1.2.2.2.2. Macroangiopathy	15
1.2.2.2.3. Microangiopathy	17
1.2.2.2.4. Neuropathic Complications	18
1.3. Biochemistry of diabetes mellitus	18
1.3.1. Fasting state	19
1.3.2. Two-hours postprandial state	20
1.3.3. Changes in protein metabolism	21
Contents	Page
1.3.4. Lipids	21
1.3.5. Uric acid:	21

1.4. Diabetes mellitus in Sudan	22
1.5. Phyllanthus Niruri	23
1.5.1. Botanical Description	24
1.5.2. Pharmacological Uses	26
Objectives	35
Chapter 2: Materials and Methods:	35
2.1. Materials	35
2.1.1. Study Subject: Diabetic Patients	35
2.1.2. Plant material	36
2.1.3. Experimental Chicks	37
2.1.4. Treatments	37
2.1.4.1. Chicks	37
2.1.4.2. Diabetic patients	37
2.1.5. Clinical Consideration	38
2.1.6. Clinical assessments	38
2.1.7. Chemical investigations	38
2.1.8. Blood collection and handling	39
2.2. Methods	40
2.2.1. Haematological Examination	40
2.2.1.1. Estimation of RBCs Count	40
2.2.1.2. Estimation of Hb. Concentration	41
2.2.1.3. Estimation of PCV	42
2.2.1.4. Estimation of MCV	43
2.2.1.5. Estimation of MCH	43
2.2.1.6. Estimation of MCHC	43
2.2.1.7. Estimation of TWBCs	44
2.2.2. Biochemical Examination	44
2.2.2.1. Estimation of Blood Sugars (Glucose)	44
2.2.2.2. Estimation of Total Protein	46
2.2.2.3. Estimation of serum albumin	47
2.2.2.4. Estimation of Uric Acid	48
2.2.2.5. Estimation of serum ALT	49
2.2.2.6. Estimation of serum AST	51
2.2.3. Histological Examination	53
2.2.3.1. Preparation of Mayer's Hematoxylin	54
2.2.4. Statistical Analysis	54
Chapter 3: Results:	55
3.1. Toxicity of phyllanthus niruri on chicks	55
Contents	Page
3.2. Histopathological findings	56
3.3. Haematological index	56
3.4. Hypoglycemic effect of p. niruri on Diabetic patients	56

3.5. Haematological index on	58
Chapter 4: Discussion	84
Chapter 5: Conclusion	94
Questionnaire	96
References	97

List of Tables

No.	Description	Page No.
1	Average body weights (g) and percentage of body weights gain of experimental chicks fed different concentrations of phyllanthus niruri plant for 3 weeks.	59
2	Mean Blood glucose conc. (mg/dl) in control chicks and chicks treated with different concentrations of P. niruri plant for 3 weeks.	60
3	Mean Albumin conc. (g/dl) in control chicks and chicks treated with different concentrations of P. niruri plant for 3 weeks.	61
4	Mean Total protein (g/dl) in control chicks and chicks treated with different concentrations of P. niruri plant for 3 weeks.	62
5	Mean Enzyme activity of AST (U/L) in control chicks and chicks treated with different concentrations of P. niruri plant for 3 weeks.	63
6	Mean Enzyme activity of ALT (U/L) in control chicks and chicks treated with different concentrations of P. niruri plant for 3 weeks.	64
7	Haematological index of diabetic control chicks and chicks fed different concentrations of Phyllanthus niruri plant for 3 weeks.	67
8	Mean Ages of the diabetic control patients and diabetic patients under p. niruri plant treatment.	69
9	Sex distribution in the study of diabetic control patients and diabetic patients under p. niruri plant treatment.	70
10	Mean Duration of diabetes disease in the two study groups	71
11	Categories of body mass index (BMI)	72
12	Family history index in the two study groups	73
13	Mean Random blood glucose levels (mg/dl) in diabetic control patients and diabetic patients under p. niruri plant treatment.	74
14	Mean Fasting blood glucose levels (mg/dl) in diabetic control patients and diabetic patients under p. niruri plant treatment.	75
15	Mean 2 hours after meal plasma glucose levels (mg/dl) in diabetic control patients and diabetic patients under p. niruri plant treatment.	76
16	Mean Total protein (g/dl) in diabetic control patients and diabetic patients under p. niruri plant treatment.	77
17	Mean Albumin concentration (g/dl) in diabetic control patients and diabetic patients under p. niruri plant treatment.	78
18	Mean Enzyme activity of ALT (U/L) in diabetic control patients and diabetic patients under p. niruri plant treatment.	79
19	Mean Enzyme activity of AST (U/L) in diabetic control patients and diabetic patients under p. niruri plant treatment.	80

20	Mean Serum uric acid concentration (mg/dl) in diabetic control patients and diabetic patients under p. niruri plant treatment.	81
21	Haematological index of diabetic control patients and diabetic patients under p. niruri plant treatment.	82
22	Correlation coefficient of different parameters of all diabetic plant treated patients (n=32) at the end of the treatment experiment.	82

List of Pictures

No.	Description	Page
1	Phyllanthus niruri plant.	25
2	Cross-section of chicks intestine treated with Phyllanthus niruri at dose rate of (5%) shows no abnormalities.	65
3	Cross-section of chicks heart treated with Phyllanthus niruri at dose rate of (5%) shows no abnormalities	65
4	Cross-section of liver of chicks treated with Phyllanthus niruri at dose rate of (5%) shows no abnormalities.	66
5	Cross-section of liver of chicks treated with Phyllanthus niruri at dose rate of (10%) shows no abnormalities.	66

List of Figures

No.	Description	Page
1	Average body weights gain in control chicks and chicks fed different concentrations of phyllanthus niruri plant for 3 weeks.	59
2	Mean blood glucose conc. (mg/dl) in control chicks and chicks fed different concentrations of phyllanthus niruri plant for 3 weeks.	60
3	Mean Albumin conc. (g/dl) in control chicks and chicks fed different concentrations of phyllanthus niruri plant for 3 weeks.	61
4	Mean Total protein (g/dl) in control chicks and chicks fed different concentrations of phyllanthus niruri plant for 3 weeks.	62
5	Mean Enzyme AST (U/L) in control chicks and chicks fed different concentrations of phyllanthus niruri plant for 3 weeks.	63
6	Mean Enzyme ALT (U/L) in control chicks and chicks fed different concentrations of phyllanthus niruri plant for 3 weeks.	64
7-A	Hb and PCV in the study groups of the chicks	67
7-B	RBCs (x106 mm ³) in the study groups of the chicks	67
7-C	WBCs (c/cmm) in the study groups of the chicks	68
8	Mean Ages of the diabetic control patients and diabetic patients under p. niruri plant treatment.	69
9	Sex distribution in the study diabetic control patients and diabetic patients under p. niruri plant treatment.	70
10	Mean Duration of diabetes disease in the study diabetic control patients and diabetic patients under p. niruri plant treatment.	71
11	Categories of body mass index (BMI) in the study diabetic control patients and diabetic patients under p. niruri plant treatment.	72
12	Family history index in the two study groups	73
13	Mean Random blood glucose levels (mg/dl) in diabetic control patients and diabetic patients under p. niruri plant treatment.	74
14	Mean Fasting blood glucose levels (mg/dl) in diabetic control patients and diabetic patients under p. niruri plant treatment.	75
15	Mean 2 hours after meal plasma glucose levels (mg/dl) in diabetic control patients and diabetic patients under p. niruri plant treatment.	76
16	Mean Total protein (g/dl) in diabetic control patients and diabetic patients under p. niruri plant treatment.	77
17	Concentration of Albumin (g/dl) in diabetic control patients and diabetic patients under p. niruri plant treatment.	78
18	Mean Enzyme activity of ALT (U/L) in diabetic control patients and diabetic patients under p.niruri plant treatment.	79
19	Mean Enzyme activity of AST (U/L) in diabetic control patients and diabetic patients under pniruri plant treatment	80

20	Mean Serum uric acid concentration (mg/dl) in diabetic control patients and diabetic patients under p.niruri plant treatment.	81
----	---	----

Abstract

The toxicity and hypoglycemic properties of the medicinal weed *phyllanthus niruri* were the subject of this study.

Forty one - day old Bovans type cockerels were used in this study, 32 non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients were also participated in this study, and other 14 NIDDM patients also were selected and served as control.

The aim of this study were to test if the herb *p. niruri* possess hypoglycemic activity by lowering blood glucose level when NIDDM patients treated with capsulated plant powder tablets of 250mg/ capsule and to rule- out the toxic action of the herb on experimental birds when fed a diet containing different concentration of *p. niruri* plant powder mixed with the bird diet at 1% 5% and 10%.

The birds after the acclimatization period were divided into 4 group and treated as follows:

1. Group (A) contain 5 chicks and kept as control by feeding the birds the normal diet which consist of a mixture of 5% concentrator, 20% ground nut cake, 11% wheat prans and 0.5% sodium chloride.
2. Group (B) consist of 11 chicks were fed by 1% of the herb *phyllanthus niruri* mixed with the normal diet.
3. Group (C) contains 12 chicks fed with a diet mixed with 5% *P. niruri* plant.
4. Group (D) contains 12 chicks fed with a dried mixed with 10% *P. niruri* plant.

During the course of the experiment all birds in the 4 groups were kept under observation to detect the progress of the growth and behavior of the birds and observe any signs of toxicity or other illness.

After the termination of the experiment, some of the bird internal body organs such as intestine, liver, kidney and heart were taken and subjected to histopathological examinations.

Blood samples from the birds were also taken during and after the feeding experiment for biochemical and hematological investigations.

As far as the study of the hypoglycemic action of *P. niruri* was concerned, 32 NIDDM were involved in this study in which they were given 6 tablets of *P. niruri* dried powder manufactured at Wafrapharma Medical Core, Omdurman, Sudan, each capsule contains about 250 mg of plant powder.

The treatment experiment continued for 60 days, during which samples of blood were taken from each participant and subjected to biochemical and hematological examinations. Blood samples were taken after the end of the treatment period in either group of the study and biochemical and hematological parameters were estimated.

The results obtained from this study showed that throughout and up to the end of treatments period, birds of either group fed *p.niruri* powder maintained normal growth condition and healthy appearance, no symptoms of toxicity or abnormal behavior were apparent. Biochemical, and hematological investigations of blood samples taken from chicks during and at the termination of the feeding experiment (3 weeks), showed no significant alteration; from control chicks when statistically assessed at $p < 0.05$ except remarkable and significant changes were achieved in blood glucose level of treated birds in comparison to control birds at $p < 0.05$ of probability.

Histopathological examinations of some body organs of the birds (intestine, liver, kidney, heart) after the feeding treatment of different concentration of *phyllanthus niruri* plant mixed with chicks diet at 1%, 5% and 10%, showed no abnormality from control, no specific lesions or

hemorrhage, or loss of architecture were detected up to the end of the experiment, this findings lead to the suggestion and confirm that phyllanthus niruri plant given orally for certain period to experimental chicks possess no toxic or poisoning properties, and may contain no poisonous compound of serious lethal effect.

Testing the effect of the treating 32 NIDDM diabetic patients for two months with capsulated tablets of dry powder of phyllanthus niruri of a concentration of 250 mg/tablet revealed that the herb at the first place had no features of side effects or incidence of unpleasant smell, and also a greater feeling of well-being was the common feeling among the NIDDM patients. The results of p. niruri treatment also exhibited remarkable and significant decrease in blood glucose levels of treated NIDDM patients at $p < 0.05$ compared with control NIDDM patients, in which random blood glucose showed progressive decrease from an average of 200 mg/dl at the onset of the treatment (initial value) to 144 mg/dl ($p < 0.05$) after 30 days and with 136 mg/dl at 60 days of the experiment (final day) at ($p < 0.05$). A significant reduction of about 32% of control value was achieved. Mean fasting blood glucose also showed progressive decrease from 150 mg/dl to 116 mg/dl at the initial day of the treatment at ($p < 0.05$), and to 110 mg/dl at the final day of the treatment with p value of < 0.05 on the contrary, mean 2-hours postprandial blood glucose, tend to be as much as stable in both diabetic NIDDM group up to the end of the treatment period. No signification alteration in the initial value (25108 mg/dl), compared with the final value (236 mg/d) after 30 days at ($p > 0.05$), and 212.8 mg/dl after 60 days of the treatment at ($p > 0.05$). The result also indicated that p.

Other biochemical parameters (total protein, albumin, uric acid, AST, ATT) and hematological index (Hb, RBCs, WBCs, PCV, MCH, MCHC) showed no significant changes from control values at any state of p. niruri treatment. A positive correlation between blood glucose and urine

glucose were existed and negative correlations between blood sugar parameters and uric acid were also existed.

The findings of this study may suggested that *phyllanthus niruri* taken as capsulated tablets as dry powder of 250 mg/dl per tablet by NIDDM patients for 60 days, has shown significant decrease in blood glucose level, and the hypoglycemic property of this herb accompanied with no incidence of side effects or bad smell or taste but with a greater feeling of well-being. The study also presented data strongly substantiated and confirm the literatures information that *phyllanthus niruri* plant is an herb or medical plant of safe and useful usage and contains no toxic or poisoning compound and safe oral or internal applications.

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة بغرض التعرف على خواص العشبة الطبية التي تستخدم في كثير من الإستعمالات العلاجية والطبية *Phyllanthus niruri* تمتلك خاصية تخفيض مستوى سكر الجلوكوز في دم مريض السكري من النوع الثاني الغير معتمد على الأنسولين كعلاج وأيضاً دراسة سمية هذه العشبة بإستخدام عدد من طيور التجارب (Bovan type cockerls chicks). تم إستخدام عدد 40 كتكوتاً في تجربة دراسة سمية العشبة وذات عمر يوم واحد، وأيضاً إشتراك عدد 32 مريضاً بالسكري من النوع الثاني بغرض دراسة تأثير هذه العشبة في تخفيض مستوى سكر جلوكوز الدم كما تم أيضاً إستيعاب عدد 14 مريضاً بالسكري من النوع الثاني أيضاً وذلك لمعاملتها كمجموعة ضابطة (مجموعة ضابطة). بعد فترة أقلمة وتهيئة الكتاكيت للتجربة لمدة أسبوع قسمت الطيور إلى 4 مجموعات كما يلي:-

1. المجموعة الأولى (مجموعة ضابطة A): وتضم عدد 5 كتاكيت ووضعت تحت الغذاء العادي للطيور.
2. المجموعة الثانية (B): وتضم عدد 11 كتكوتاً وأعطيت غذاء يحتوي على نسبة 1% من مسحوق العشبة *Phyllanthus niruri*.
3. المجموعة الثالثة (C): وتضم عدد 12 كتكوتاً ووضعت تحت غذاء يحتوي على 5% من مسحوق العشبة.
4. المجموعة الرابعة (D): وتضم عدد 12 كتكوتاً ووضعت تحت غذاء يحتوي على 10% من مسحوق العشبة.

إستمرت هذه التجربة لمدة ثلاثة اسابيع حيث تم خلالها مراقبة نمو وحركة الطيور ومراقبة ظهور حالات تسمم أو موت بين الطيور حتى نهاية التجربة، وعند نهاية التجربة أخذت عينات من دم الطيور في المجموعات الأربعة وتم تحليل المكونات الحيوية لها مثل سكر الجلوكوز، البروتين الكلي، الألبومين، إنزيمات الكبد، وحامض اليوريك، وأيضاً تحليل مكونات الدم الأخرى ثم أخذت بعض عينات من الأعضاء الداخلية لهذه الطيور مثل الكبد والكلى والأمعاء الدقيقة ودراستها نسيجياً.

أما فيما يتعلق بدراسة خواص هذه العشبة الطبية كمخفضة لسكر الجلوكوز في الدم فقد تم تصنيع المسحوق الجاف لهذه العشبة على هيئة كبسولات طبية وذلك بمصنع الأدوية بالسلاح الطبي بإمدرمان حيث تحتوي كل كبسولة على حوالي 250 ملليجرام من مسحوق العشبة الجاف وذلك تحت المواصفات القياسية المتبعة في التصنيع الدوائي.

إستمرت فترة هذه التجربة 60 يوماً حيث وضع عدد 32 من المرضى تحت العلاج بإستخدام الكبسولات المحتوية على مسحوق العشبة يومياً بمعدل 6 كبسولات يومياً تؤخذ بعد الوجبات الغذائية.

في أثناء سير تجربة المعاملة هذه أخذت عينات من دم المرضى بغرض تحليل مكونتها عند 30 يوماً و 60 يوماً من المعاملات. أما المجموعة الضابطة من مرضى السكري (14 مريضاً) فقد سمح لها بإستخدام الأدوية المخصصة لخفض السكر.

1. نتائج دراسة سمية العشبة على الكتاكيت:

أوضحت نتائج معاملة طيور التجربة بالتراكيز المختلفة من مسحوق العشبة لمدة ثلاثة أسابيع أن الطيور كانت ذات نمو طبيعي وازدياد مستمر ولم تظهر عليها أعراض التسمم مثل الهزال وعدم الحركة والإسهال وكانت ذات حركة ونشاط طبيعيين طوال فترة التجربة كما أوضحت نتائج تحليل عينات من دم هذه الطيور عدم وجود تغيرات في تركيز المكونات الحيوية للدم مثل تركيز البروتين الكلى وتركيز الألبومين وتركيز حامض اليوريك وبيضا إنزيمات الكبد، إلا أن نتائج تحليلات السكر في دم الطيور أثبتت وجود حالة إنخفاض في سكر الجلوكوز وذو دلالة معنوية تبلغ (0.030) و(0.002) وعند فرق معنوي يعادل أو يساوي ($P \leq 0.05$).

أما نتائج الدراسة النسيجية Histopathological study لبعض عينات من الأعضاء الداخلية للطيور فإتضح أنه لا توجد تغيرات ذات دلالات مرضية تذكر في تلك الأعضاء، مما يخلص إلي أن هذه العشبة عند إستخدامها بالتراكيز المذكورة ليس لها تأثير سام أو ضار على طيور التجارب، أو لا تحتوي على أي من المواد التي تسبب حالات التسمم والموت.

2. نتائج دراسة خواص العشبة في خفض سكر الدم:

كانت العشبة التي أعطيت لعدد 32 مريض من مرضى السكري بمعدل 6 كبسولات يوميا ولمدة 60 يوما. كانت ذات طعم مستحسن كما أفاد المرضى، ولا يوجد طعم غير مستساغ أو رائحة لها غير مقبولة، بل كان المرضى في غاية الرضى والقبول طوال فترة التجربة أوضحت نتائج المعاملة أن العشبة لها تأثير واضح في خفض مستويات سكر الجلوكوز عند دم المرضى حيث يوجد إنخفاض ذو دلالة إحصائية معنوية لسكر الجلوكوز في الحالة العشوائية حيث إنخفض التركيز (200 mg/dl) عند بداية المعاملة إلى (144 mg/dl) بعد 30 يوما من المعاملة وإلى (136 mg/dl) بعد 60 يوما من المعاملة وأيضاً هناك إنخفاض ذو دلالة معنوية في تركيز على مستوي ($p \leq 0.05$) في تركيز سكر بعد الصيام وذلك بإنخفاض في التركيز (150 mg/dl) عند بداية المعاملة إلى (116 mg/dl) بعد 30 يوما وإلى (110 mg/dl) بعد 60 يوما من المعاملة. أما في حالة قياس سكر الدم بعد ساعتين من تناول آخر وجبة غذائية فلو حظ عدم وجود تغيرات تذكر في مستوى السكر عند المرضى أثناء وبعد المعاملة مقارنة بتركيز الجلوكوز لدى المجموعة الضابطة.

كما أوضحت نتائج الدراسة عدم وجود تغيرات ذات دلالات معنوية إحصائية تذكر عن قياس بعض المكونات الحيوية مثل البروتين الكلى والألبومين وحامض اليوريك وإنزيمات الكبد. فقد كانت التراكيز ذات مستويات متقاربة لتركيز المجموعة الضابطة.

كما أوضحت الدراسة أيضاً هناك إرتباط موجب بين مستويات الجلوكوز التي تم تقديرها في دم المرضى. وإيضاً هناك إرتباط سلبي بين تركيز هذه السكريات وتركيز حامض اليوريك في دم المرضى.

وتخلص هذه الدراسة إلى أن العشبة الطبية *phyllanthus niruri* والتي أعطيت لمرضى السكري من النوع الثاني الغير معتمد على الأنسولين كعلاج وعلى هيئة كبسولات مصنعة تحتوي كل كبسولة على 250 ملليجرام من مسحوق العشبة الجاف. كان لها تأثير مخفض لمستويات سكر دم المرضى بعد فترات المعاملة وأنه لا يوجد لها أي تأثير على مستوى تركيز

لبعض المكونات الحيوية الأخرى، مثل البروتين الكلي والاليومين وحامض اليوريك وإنزيمات الكبد. كما تخلص هذه الدراسة أيضاً إلى أن العشبة الطبية p. niruri عند استخدامها بالتراكيز المذكورة أعلاه كغذاء للطيور ليس لها تأثير سام أو قاتل على الطيور.

Abbreviations

Hb:	Heamoglobin
RBC:	Red Blood Cell Count
TWBC:	Total White Blood Cell Count
PCV:	Packed Cell Volume
MCV:	Mean Cell Volume
MCH:	Mean Cell Heamoglobin
MCHC:	Mean Cell Heamoglobin Concentration
FBG:	Fasting Blood Glucose
RBG:	Random Blood Glucose
2-PPG:	2 Hours Postprandial Glucose
Alb:	Albumin
AST:	Aspartate Transferase
ALT:	Alanine Transferase
UA:	Uric Acid
UG:	Urine Glucose
T-Protein:	Total Protein